

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Oktober 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/076495 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: A61K 38/28,
47/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP02/02625

(22) Internationales Anmeldedatum:
9. März 2002 (09.03.2002)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10114178.5 23. März 2001 (23.03.2001) DE

(71) Anmelder: AVENTIS PHARMA DEUTSCHLAND
GMBH [DE/DE]; Brüningstrasse 50, 65929 Frankfurt
(DE).

(72) Erfinder: BODERKE, Peter; Johannesallee 16, 65929
Frankfurt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,

CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ,
LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: INSULIN PREPARATIONS, WHICH DO NOT CONTAIN ANY ZINC OR ONLY A SMALL QUANTITY OF ZINC
AND WHICH HAVE AN IMPROVED STABILITY

(54) Bezeichnung: ZINKFREIE UND ZINKARME INSULINZUBEREITUNGEN MIT VERBESSERTER STABILITÄT

(57) Abstract: The invention relates to a pharmaceutical formulation containing: a polypeptide selected from a group containing insulin, an insulin metabolite, an insulin analog, an insulin derivative or combinations thereof; a surfactant or combinations of several surfactants; optionally, a preservative or combinations of several preservatives, and; optionally, an isotonicizing agent, buffers or additional adjuvants or combinations thereof, whereby the pharmaceutical formulation does not contain any zinc or only a small quantity of zinc. The invention also relates to the production of insulin preparations of the aforementioned type.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft eine pharmazeutische Formulierung enthaltend ein Polypeptid ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend Insulin, einen Insulinmetaboliten, ein Insulinanalogon, ein Insulinderivat oder Kombinationen davon; ein Tensid oder Kombinationen mehrerer Tenside; optional ein Konservierungsmittel oder Kombinationen mehrerer Konservierungsmittel; und optional ein Isotonisierungsmittel, Puffer oder weitere Hilfsstoffe oder Kombinationen davon, wobei die pharmazeutische Formulierung frei von oder arm an Zink ist; und die Herstellung solcher Insulinzubereitungen.

WO 02/076495 A1

Beschreibung

Zinkfreie und zinkarme Insulinzubereitungen mit verbesserter Stabilität

5

Die Erfindung betrifft stabilisierte pharmazeutische Formulierungen enthaltend ein Polypeptid ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend Insulin (z.B. humanes Insulin, Rinder- oder Schweine-Insulin), ein Insulinanalogon, ein Insulinderivat, aktive Insulinmetaboliten oder Kombinationen davon; ein Tensid oder Kombinationen
10 mehrerer Tenside und optional ein Konservierungsmittel oder Kombinationen mehrerer Konservierungsmittel sowie optional ein Isotonisierungsmittel, Puffer oder weitere Hilfsstoffe oder Kombinationen davon, wobei die pharmazeutische Formulierung zinkarm oder frei von Zink ist. Diese Formulierungen können zur Behandlung von Diabetes eingesetzt werden und sind besonders für den Einsatz in Insulinpumpen,
15 Pens, Injektoren, Inhalatoren oder für Zubereitungen, bei denen eine erhöhte physikalische Stabilität erforderlich ist, einsetzbar. Die Erfindung betrifft ebenfalls parenterale Zubereitungen, die solche Formulierungen enthalten und bei Diabetes angewendet werden können sowie Methoden, um die Zubereitungen herzustellen und die Stabilität von Insulinzubereitungen zu verbessern.

20

Weltweit leiden etwa 120 Mio. Menschen an Diabetes mellitus. Darunter sind etwa 12 Mio. Typ I-Diabetiker, für die die Substitution der fehlenden endokrinen Insulinsekretion die einzige derzeit mögliche Therapie darstellt. Die Betroffenen sind lebenslang, in der Regel mehrmals täglich, auf Insulininjektionen angewiesen. Im
25 Gegensatz zum Typ I-Diabetes besteht beim Typ II-Diabetes nicht grundsätzlich ein Mangel an Insulin, jedoch wird in einer Vielzahl von Fällen, vor allem im fortgeschrittenen Stadium, die Behandlung mit Insulin, gegebenenfalls in Kombination mit einem oralen Antidiabetikum, als günstigste Therapieform angesehen.

30

Beim Gesunden ist die Insulinfreisetzung durch den Pankreas strikt an die Konzentration der Blutglucose gekoppelt. Erhöhte Blutglucosespiegel, wie sie nach Mahlzeiten auftreten, werden durch eine entsprechende Steigerung der

Insulinsekretion rasch kompensiert. Im nüchternen Zustand sinkt der Plasmainsulinspiegel auf einen basalen Wert ab, der ausreicht, eine kontinuierliche Versorgung insulinempfindlicher Organe und Gewebe mit Glucose zu gewährleisten und die hepatische Glucoseproduktion in der Nacht niedrig zu halten. Der Ersatz der körpereigenen Insulinsekretion durch exogene, meist subcutane Applikation von Insulin erreicht in der Regel die oben beschriebene Qualität der physiologischen Regulation der Blutglucose nicht annähernd. Häufig kommt es zu Entgleisungen der Blutglucose nach oben oder unten, die in ihren schwersten Formen lebensbedrohlich sein können. Daneben stellen jedoch auch über Jahre erhöhte Blutglucosespiegel ohne anfängliche Symptome ein erhebliches Gesundheitsrisiko dar. Die großangelegte DCCT-Studie in den USA (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) N. Engl. J. Med. 329, 977-986) wies eindeutig nach, daß chronisch erhöhte Blutglucosespiegel wesentlich für die Entwicklung diabetischer Spätschäden verantwortlich sind. Diabetische Spätschäden sind mikro- und makrovaskuläre Schädigungen, die sich u.U. als Retino-, Nephro-, oder Neuropathie manifestieren und zu Erblindung, Nierenversagen sowie dem Verlust von Extremitäten führen und darüber hinaus mit einem erhöhten Risiko für Herz/Kreislaufkrankungen einhergehen. Daraus ist abzuleiten, daß eine verbesserte Therapie des Diabetes in erster Linie darauf abzielen muß, die Blutglucose möglichst eng im physiologischen Bereich zu halten. Nach dem Konzept der intensivierten Insulintherapie soll dies durch mehrmals tägliche Injektionen von schnell und langsam wirkenden Insulinzubereitungen erreicht werden. Rasch wirkende Formulierungen werden zu den Mahlzeiten gegeben, um den postprandialen Anstieg der Blutglucose auszugleichen. Langsam wirkende Basalinsuline sollen die Grundversorgung mit Insulin insbesondere während der Nacht sicherstellen, ohne zu einer Hypoglykämie zu führen.

Insulin ist ein Polypeptid aus 51 Aminosäuren, die sich auf 2 Aminosäureketten verteilen: die A Kette mit 21 Aminosäuren und die B-Kette mit 30 Aminosäuren. Die Ketten sind durch 2 Disulfidbrücken miteinander verbunden. Insulinzubereitungen werden seit vielen Jahren zur Diabetestherapie eingesetzt. Dabei werden nicht nur natürlich vorkommende Insuline verwendet, sondern neuerdings auch Insulinderivate und -analoga.

Insulinaloga sind Analoga von natürlich vorkommenden Insulinen, nämlich Humaninsulin oder tierischen Insulinen, welche sich durch Substitution wenigstens eines natürlich auftretenden Aminosäurerestes mit anderen Aminosäureresten und/oder Addition/Entfernen wenigstens eines Aminosäurerestes von dem
5 entsprechenden, ansonsten gleichen natürlich vorkommenden Insulin unterscheiden. Es kann sich bei den hinzugefügten und / oder ersetzten Aminosäureresten auch um solche handeln, die nicht natürlich vorkommen.

Insulinderivate sind Derivate von natürlich vorkommendem Insulin oder einem
10 Insulinalogon, welche durch chemische Modifizierung erhalten werden. Die chemische Modifikation kann z.B. in der Addition einer oder mehrerer bestimmter chemischer Gruppen an eine oder mehrere Aminosäuren bestehen.

In der Regel haben Insulinderivate und Insulinaloga gegenüber humanem Insulin
15 eine etwas veränderte Wirkung.

Insulinaloga mit beschleunigtem Wirkungseintritt werden in EP 0 214 826, EP 0 375 437 und EP 0 678 522 beschrieben. EP 0 124 826 bezieht sich u.a. auf Substitutionen von B27 und B28. EP 0 678 522 beschreibt Insulinaloga, die in der
20 Position B29 verschiedene Aminosäuren, vorzugsweise Prolin, aufweisen, jedoch nicht Glutaminsäure. EP 0 375 437 umfaßt Insulinaloga mit Lysin oder Arginin in B28, die optional zusätzlich in B3 und/oder A21 modifiziert sein können.

25 In der EP 0 419 504 werden Insulinaloga offenbart, die gegen chemische Modifikationen geschützt sind, in dem Asparagin in B3 und wenigstens eine weitere Aminosäure in den Positionen A5, A15, A18 oder A21 verändert sind.

In der WO 92/00321 werden Insulinaloga beschrieben, bei denen wenigstens eine
30 Aminosäure der Positionen B1-B6 durch Lysin oder Arginin ersetzt ist. Derartige Insuline weisen gemäß WO 92/00321 eine verlängerte Wirkung auf.

Die auf dem Markt befindlichen Insulinzubereitungen von natürlich vorkommenden Insulinen zur Insulinsubstitution unterscheiden sich in der Herkunft des Insulins (z.B. Rind, Schwein, Humaninsulin), sowie der Zusammensetzung, womit das Wirkprofil (Wirkeintritt und Wirkdauer) beeinflusst werden kann. Durch Kombination

5 verschiedener Insulinpräparate lassen sich unterschiedlichste Wirkprofile erzielen und möglichst physiologische Blutzuckerwerte einstellen. Seit einiger Zeit sind nicht nur die genannten natürlich vorkommenden Insuline, sondern auch Zubereitungen von Insulinderivaten oder Insulinanaloga auf dem Markt, die eine veränderte Kinetik zeigen. Die rekombinante DNA Technologie ermöglicht heutzutage die Herstellung von

10 solchen modifizierten Insulinen. Hierzu zählen sogenannte monomere Insulinanaloga wie Insulin Lispro, Insulin Aspart und HMR 1964 (Lys(B3), Glu(B29) Humaninsulin) mit einem schnellen Wirkeintritt, sowie Insulin Glargin mit einer verlängerten Wirkdauer.

Neben der Wirkdauer ist die Stabilität der Zubereitung für die Patienten sehr wichtig. Stabilisierte Insulinformulierungen mit erhöhter physikalischer Langzeitstabilität werden

15 insbesondere für Zubereitungen benötigt, die besonderen mechanischen Belastungen oder höheren Temperaturen ausgesetzt sind. Hierzu zählen z.B. Insuline in Applikationssystemen wie Pens, Inhalationssystemen, nadellosen Injektionssystemen oder Insulinpumpen. Insulinpumpen werden entweder am Körper des Patienten getragen oder implantiert. In beiden Fällen ist die Zubereitung der Körperwärme und

20 Bewegung sowie der Förderbewegung der Pumpe und damit einer sehr hohen thermomechanischen Belastung ausgesetzt. Da auch Insulinpens (Einmal- oder wiederverwertbare Pens) meist am Körper getragen werden, gilt hier das gleiche. Bisherige Zubereitungen haben nur eine limitierte Stabilität unter diesen Bedingungen. Insulin liegt in neutraler Lösung in pharmazeutischer Konzentration in Form

25 stabilisierter zinkhaltiger Hexamere vor, die aus 3 identischen Dimereinheiten aufgebaut sind (Brange et al., Diabetes Care 13:923-954 (1990)). Durch Veränderung der Aminosäuresequenz kann die Assoziation von Insulin verringert werden. Somit liegt z.B. das Insulinanalogon Lispro vorwiegend als Monomer vor und wird dadurch schneller resorbiert und zeigt eine kürzere Wirkdauer (HPT Ammon und C. Werning; Antidiabetika; 2. Aufl.; Wiss. Verl.-Ges. Stuttgart; 2000; S. 94.f). Gerade die schnell

30 wirksamen Insulinanaloga, die in Monomeren- oder Dimerenform vorliegen, zeigen jedoch eine verringerte Stabilität und erhöhte Aggregationsneigung bei thermischer

und mechanischer Belastung. Sie macht sich häufig in Trübungen und Ausfällungen von unlöslichen Aggregaten bemerkbar. (Bakaysa et al, US Patent Nr. 5474978).

Diese höhermolekularen Transformationsprodukte (Dimere, Trimere, Polymere) und Aggregate verringern nicht nur die applizierte Insulindosis sondern können auch

- 5 Irritationen oder Immunreaktionen beim Patienten auslösen. Ausserdem können solche unlöslichen Aggregate die Kanülen und Schläuche der Pumpen zusetzen und verstopfen. Da Zink zu einer zusätzlichen Stabilisierung des Insulins führt, sind zinkfreie oder zinkarme Zubereitungen von Insulin und Insulinanaloga besonders anfällig für Instabilitäten. Insbesondere monomere Insulinanaloga mit einem schnellen
- 10 Wirkeintritt neigen sehr schnell zur Aggregation und physikalischen Instabilitäten, weil die Bildung von unlöslichen Aggregaten über Monomere des Insulins abläuft. Um die Qualität einer Insulinzubereitung zu gewährleisten, ist es notwendig, die Bildung von Aggregaten zu vermeiden.

- Es gibt verschiedene Ansätze, Insulinformulierungen zu stabilisieren. So sind in der
- 15 internationalen Patentanmeldung WO98/56406 stabilisierte Formulierungen durch TRIS oder Arginin Puffer beschrieben worden. Patent US 5866538 beschreibt eine Insulin-Zubereitung, die Glycerol und Natriumchlorid in Konzentrationen von 5 – 100 mM enthält und eine erhöhte Stabilität aufweisen soll. US Patent 5948751 beschreibt Insulinzubereitungen mit erhöhter physikalischer Stabilität, die durch Zusatz von
- 20 Mannitol oder ähnlichen Zuckern erreicht wird. Der Zusatz von überschüssigem Zink zu einer zinkhaltigen Insulinlösung kann ebenfalls die Stabilität erhöhen (J. Brange et al., Diabetic Medicine, 3: 532-536, 1986). Auch der Einfluss des pH Wertes und verschiedener Hilfsstoffe auf die Stabilität von Insulinzubereitungen wurde ausführlich beschrieben (J. Brange & L. Langkjaer, Acta Pharm. Nordica 4: 149-158).
- 25 Oft reichen diese Stabilisierungsmethoden für erhöhte Anforderungen (Verbesserung der Haltbarkeit bei Raum- oder Körpertemperatur und mechanischer Belastung) oder für sogenannte monomere Insulinanaloga bzw. schnell wirksame Insuline, die besonders anfällig für physikalischen Stress sind, nicht aus. Zudem enthalten alle kommerziellen Insulinzubereitungen Zink, welches zugesetzt wird, um die Zubereitung
- 30 zu stabilisieren. So beschreibt Bakaysa et al. im US Patent 5474978 stabilisierte Formulierungen aus Insulinkomplexen, die aus 6 Insulinanalogmonomeren, 2 Zinkatomen und mindestens 3 Molekülen eines phenolischen Konservierungsmittels

bestehen. Zusätzlich können diese Formulierungen einen physiologisch akzeptablen Puffer und ein Konservierungsmittel enthalten. Will man hingegen zinkfreie oder zinkarme Insulinzubereitungen herstellen, so sind die genannten Stabilisierungsmethoden nicht ausreichend für eine vermarktungsfähige Zubereitung.

- 5 Beispielsweise konnte eine zinkfreie Zubereitung von Insulin Lispro aufgrund unzureichender physikalischer Stabilität nicht entwickelt werden (Bakaysa et al., Protein Science (1996), 5:2521-2531). Zinkarme oder zinkfreie Insulinformulierungen mit ausreichender Stabilität, insbesondere physikalischer Stabilität sind im Stand der Technik nicht beschrieben.

10

Der vorliegenden Erfindung lag somit die Aufgabe zugrunde, zinkfreie Zubereitungen für Insuline und deren Derivate und Analoga zu finden, welche sich durch eine hohe Stabilität auszeichnen.

- 15 Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass der Zusatz von Tensiden (Emulgatoren) wie z.B. Poloxamere oder Polysorbate (Tween®) die Stabilität von Insulinzubereitungen drastisch erhöhen kann und somit sogar zinkfreie Zubereitungen hergestellt werden können, die eine überlegene Stabilität aufweisen, um auch in Infusionspumpen oder anderen Applikationssystemen verwendet werden zu können.
- 20 Besonders unter Stressbedingungen zeigen diese Zubereitungen erhöhte Stabilität. Dies gilt sowohl für Insulin, Insulinanaloga, Insulinderivate oder Mischungen daraus.

- Insulin bildet in neutralen Zubereitungen mit Zinkionen Komplexe. Hierbei bilden sich bei ausreichender Zinkkonzentration aus 6 Insulinmolekülen und 2 Zinkionen stabile
- 25 Hexamere. Zur Ausbildung dieser Struktur ist eine Zinkkonzentration von mindestens 0,4 % (w/w) bezogen auf das Insulin erforderlich. Dies entspricht bei einer Zubereitung von 100 IU/ml Insulin einer Konzentration von ca. 13 µg/ml Zink. Ein Überschuss an Zink (z.B. 4 Zinkionen pro Hexamer) stabilisiert die Zubereitung gegenüber physikalischem Stress nochmals deutlich (J. Brange et al., Neutral insulin solutions
- 30 physically stabilized by the addition of Zn^{2+} . Diabetic Med. 3, 532-536 (1986)). Im Gegensatz dazu ist in Zubereitungen mit geringeren Zinkkonzentrationen (< 0,4 Gewichtsprozent bezogen auf Insulin) die Bildung der Hexamere reduziert. Dies führt

zu einer dramatisch reduzierten Stabilität der Zubereitung (J. Brange and L. Langkjaer; Acta Pharm Nord, 4: 149-158 (1992)). „Zinkfrei“ oder „Zinkarm“ im Sinne dieser Anmeldung bedeutet daher das Vorhandensein von weniger als 0,4 Gewichtsprozent Zink bezogen auf den Insulingehalt der Zubereitung, vorzugsweise weniger als 0,2 Gewichtsprozent bezogen auf den Insulingehalt. Für eine gängige Insulinzubereitung mit 100 Einheiten pro Milliliter (0,6 $\mu\text{mol/ml}$) bedeutet dies zum Beispiel eine Konzentration von weniger als 13 $\mu\text{g/ml}$ Zn^{++} -Ionen (0,2 $\mu\text{mol/ml}$), vorzugsweise weniger als 6,5 $\mu\text{g/ml}$ Zn^{++} -Ionen in der pharmazeutischen Zubereitung, bezogen auf eine Insulinkonzentration von 100 Einheiten/ml. Die Zinkfreiheit kann auch durch Zugabe von Zink komplexierenden Stoffen, wie z.B. Citrat oder EDTA erreicht werden, sodass nicht ausreichend Zinkionen zur Bildung des Insulin/Zink Hexamerenkomplexes zur Verfügung stehen.

Die pharmazeutischen Zubereitungen enthalten 60-6000 nmol/ml, bevorzugt 240-3000 nmol/ml eines Insulins, eines Insulinmetaboliten, eines Insulinanalogons oder eines Insulinderivats.

Als Tenside können unter anderem nichtionische oder ionische (anionische, kationische oder amphotere) Tenside Verwendung finden. Insbesondere sind pharmazeutisch gebräuchliche Tenside bevorzugt, wie z.B.: Alkali- Amin- und Erdalkaliseifen (Stearate, Palmitate, Oleate, Rizinate), Alkylsulfate und Alkylsulfonate (Natriumlaurylsulfat, Natriumcetylsulfat, Natriumstearylsulfat), Natürliche Tenside (Gallensäuresalze, Saponine, Arabisches Gummi), Kationische Tenside (Alkoniumbromide, Cetylpyridiniumchlorid, Cetrimid), Fettalkohole (Cetylalkohol, Stearylalkohol, Cholesterol), Partial- und Fettsäureester mehrwertiger Alkohole wie des Glycerols, Sorbitols u.ä. (Span[®], Tween[®], Myrj[®], Brij[®]), Cremophor[®] oder Poloxamere.

Die Tenside liegen in der pharmazeutischen Zusammensetzung in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{g/ml}$ – 10000 $\mu\text{g/ml}$, bevorzugt 1 $\mu\text{g/ml}$ – 1000 $\mu\text{g/ml}$ vor.

Die Zubereitung kann desweiteren Konservierungsmittel (z.B. Phenol, Kresol, Parabene), Isotonisierungsmittel (z.B. Mannitol, Sorbitol, Lactose, Dextrose,

Trehalose, Natriumchlorid, Glycerol) Puffersubstanzen, Salze, Säuren und Laugen sowie weitere Hilfstoffe enthalten. Diese Substanzen können jeweils einzeln oder auch als Mischungen vorliegen.

- 5 Glycerol, Dextrose, Lactose, Sorbitol und Mannitol liegen üblicherweise in der pharmazeutischen Zubereitung in einer Konzentration von 100 – 250 mM, NaCl in einer Konzentration bis zu 150 mM vor. Puffersubstanzen, wie z.B. Phosphat-, Acetat-, Citrat, Arginin, Glycylglycin oder TRIS (d.h. 2-Amino-2-Hydroxymethyl-1,3-Propandiol) Puffer sowie entsprechende Salze, sind in einer Konzentration von 5 – 250 mM,
10 bevorzugt 10 – 100 mM vorhanden.
Weitere Hilfstoffe können unter anderem sein Salze, Arginin, Protamin, oder Surfen®.

- Gegenstand der Erfindung ist daher eine pharmazeutische Formulierung enthaltend ein Polypeptid ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend Insulin, ein Insulinanalogon,
15 ein Insulinderivat, einen aktiven Insulinmetaboliten oder Kombinationen davon; ein Tensid oder Kombinationen mehrerer Tenside; optional ein Konservierungsmittel oder Kombinationen mehrerer Konservierungsmittel; und optional ein Isotonisierungsmittel, Puffersubstanzen und/oder weitere Hilfsstoffe oder Kombinationen davon, wobei die pharmazeutische Formulierung frei von oder arm an Zink ist; bevorzugt ist eine solche
20 pharmazeutische Formulierung, wobei das Tensid ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend Alkali-, Amin-, Erdalkaliseifen, Alkylsulfate, Alkylsulfonate, natürliche Tenside, kationische Tenside, Fettalkohole, Partial- und Fettsäureester mehrwertiger Alkohole wie des Glycerols und Sorbitols, Polyole; wobei die genannten Seifen ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Stearate, Palmitate, Oleate,
25 Rizinolate; wobei die Alkylsulfate ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Natriumlaurylsulfat, Natriumcetylsulfat, Natriumstearylsulfat; wobei die natürlichen Tenside ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Gallensäuresalze, Saponine, Arabisches Gummi, Lecithine; wobei die kationischen Tenside ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Alkoniumbromide, Cetylpyridiniumchlorid, Cetrimid®; wobei
30 die Fettalkohole ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Cetylalkohol, Stearylalkohol, Cholesterol; wobei die Partial- und Fettsäureester und -ether des Glycerols und Sorbitols ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Span®,

Tween[®], Myrj[®], Brij[®], Cremophor[®]; wobei die Polyole ausgewählt werden aus der Gruppe Polypropylenglycole, Polyethylenglycole, Poloxamere, Pluronic, Tetronics; wobei das Konservierungsmittel ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend Phenol, Kresol, Parabene; wobei das Isotonisierungsmittel ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend Mannitol, Sorbitol, Natriumchlorid, Glycerol; wobei die Hilfsstoffe ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Puffersubstanzen, Säuren, Laugen; wobei das Insulin ein in der Natur vorkommendes Insulin, beispielsweise humanes, Rinder oder Schweine-Insulin ist; wobei das Insulinanalogon ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend Gly(A21)- Arg(B31)- Arg(B32)- Humaninsulin; Lys(B3)- Glu(B29)- Humaninsulin; Lys^{B28}Pro^{B29} Humaninsulin, B28 Asp-Humaninsulin, Humaninsulin, bei dem Prolin in der Position B28 substituiert wurde durch Asp, Lys, Leu, Val oder Ala und wo in Position B29 Lys durch Pro substituiert sein kann; AlaB26-humaninsulin; Des(B28-B30)-humaninsulin; Des(B27)-humaninsulin oder Des(B30)-humaninsulin;

15 wobei das Insulinderivat ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend B29-N-myristoyl-des(B30) Humaninsulin, B29-N-palmitoyl-des(B30) Humaninsulin, B29-N-myristoyl Humaninsulin, B29-N-palmitoyl Humaninsulin, B28-N-myristoyl Lys^{B28}Pro^{B29} Humaninsulin, B28-N-palmitoyl-Lys^{B28}Pro^{B29} Humaninsulin, B30-N-myristoyl-Thr^{B29}Lys^{B30} Humaninsulin, B30-N-palmitoyl- Thr^{B29}Lys^{B30} Humaninsulin, B29-N-(N-palmitoyl-γ-glutamyl)-des(B30) Humaninsulin, B29-N-(N-lithocholyl-γ-glutamyl)-des(B30) Humaninsulin, B29-N-(ω-carboxyheptadecanoyl)-des(B30) Humaninsulin und B29-N-(ω-carboxyheptadecanoyl) Humaninsulin.

20

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine pharmazeutische Formulierung wie oben beschrieben, bei der das Insulin, das Insulinanalogon, der aktive Insulinmetabolit und/oder das Insulinderivat in einer Konzentration von 60 – 6000 nmol/ml, vorzugsweise in einer Konzentration von 240 – 3000 nmol/ml vorliegt (dies entspricht etwa einer Konzentration von 1,4 – 35 mg/ml oder 40 – 500 Einheiten/ml); bei der das Tensid in einer Konzentration von 0,1 – 10000 µg/ml, vorzugsweise in einer Konzentration von 1 – 1000 µg/ml vorliegt.

30

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine pharmazeutische Formulierung wie oben ausgeführt, bei der Glycerol und/oder Mannitol in einer Konzentration von 100 – 250 mM, und/oder Chlorid vorzugsweise in einer Konzentration bis zu 150 mM vorliegt.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine pharmazeutische Formulierung wie oben ausgeführt, bei der eine Puffersubstanz in einer Konzentration von 5 – 250 mM vorliegt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine pharmazeutische Insulinformulierung, die weitere Zusätze wie z.B. Salze, Protamin oder Surfen® enthält, welche die

- 10 Freigabe von Insulin retardieren. Auch Mischungen aus solchen Retardinsulinen mit oben beschriebenen Formulierungen sind darin eingeschlossen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Methode zur Herstellung solcher pharmazeutischer Formulierungen. Ebenso ist ein weiterer Gegenstand der Erfindung die Anwendung solcher Formulierungen zur Behandlung von Diabetes mellitus.

- 15 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung bzw. der Zusatz von Tensiden als Stabilisator während des Herstellungsprozesses von Insulin, Insulinanaloga oder Insulinderivaten oder deren Zubereitungen.

- 20 Bei den beschriebenen pharmazeutischen Formulierungen enthaltend ein Polypeptid ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend Insulin, ein Insulinanalogon, ein Insulinderivat, einen aktiven Insulinmetaboliten oder Kombinationen davon, liegt der pH-Wert zwischen 2 und 12, bevorzugt zwischen 6 und 8,5 und besonders bevorzugt zwischen 7 und 7,8.

- 25 Im folgenden wird die Anmeldung anhand einiger Beispiele beschrieben, die keinesfalls beschränkend wirken sollen.

Beispiele:

- 30 Vergleichsuntersuchungen: Es werden verschiedene zinkfreie Zubereitungen mit dem Insulinanalogon HMR1964 (Lys(B3), Glu(B29), Humaninsulin) hergestellt. Dazu wird zinkfreies HMR1964 und die übrigen Bestandteile in einem Teil Wasser für

Injektionszwecke gelöst und der pH Wert mit Salzsäure/NaOH auf 7,3 +/- 0,2 eingestellt und auf das Endvolumen aufgefüllt. Die Konzentration von HMR 1964 beträgt bei jedem der unten beschriebenen Versuche 3,5 mg/ml (entspricht 100 Einheiten/ml). Eine zweite Zubereitung wird identisch hergestellt, jedoch wird noch
5 eine bestimmte Menge eines Tensids hinzugegeben. Die Lösungen werden in 5 ml oder 10 ml Glasgefäße (Vials) abgefüllt und verbördelt. Diese Gefäße werden nun Stressbedingungen ausgesetzt:

1. Rotationstest: Jeweils 5 Gefäße einer Charge sowie 5 Gefäße der Vergleichscharge werden einem Rotationstest unterzogen. Hierzu werden die
10 Gefäße in einen Rotator gespannt und bei 37°C bei 60 U/min über Kopf (360°) rotiert. Nach definierten Zeiten wird die Trübung der in den Gefäßen befindlichen Zubereitungen gegen Trübungsstandards verglichen oder mit einem Labortrübungsphotometer (Nephelometer) in Formazin Nephelometrischen Einheiten (FNU) bestimmt. Der Versuch wird solange durchgeführt, bis in allen
15 Gefässen ein Trübungswert von 18 FNU überschritten wird.
2. Schütteltest: Die Gefäße werden auf einen Laborschüttler in einem Inkubator gestellt und bei 30°C mit 100 Bewegungen/min geschüttelt. Nach definierten Zeiten wird der Trübungswert der Proben mittels eines Labor-Trübungsphotometers
20 (Nephelometer) in Formazin Nephelometrischen Einheiten (FNU) bestimmt.

Beispiel 1: Stabilisierung von HMR1964 durch Zusatz von Zink im Rotationstest

- a) In einer wässrigen Lösung, die in der finalen Formulierung 2,7 mg/ml m-Kresol, 20
25 mg/ml Glycerol und 6 mg/ml Trometamol (Tris) enthält, wird zinkfreies HMR1964 (so berechnet, dass in der fertigen Formulierung eine Konzentration von 3,5 mg/ml entsteht) gelöst und der pH Wert mit 1 N Salzsäure/1 N NaOH auf 7,2 – 7,4 (gemessen bei Raumtemperatur) eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser zum Endvolumen aufgefüllt und über einen 0,2 µm Filter steril filtriert. Anschliessend
30 wird sie in 5 ml Injektionsfläschchen gefüllt und mit Kappen verschlossen.

- b) Eine Vergleichslösung wird identisch hergestellt, jedoch wird vor dem Auffüllen mit Wasser eine entsprechende Menge einer 0,1 %igen Zinkchlorid Stammlösung hinzugefügt, sodass sich in der fertigen Formulierung ein Zinkgehalt von 15 µg/ml ergibt.

5

Jeweils 5 Muster werden anschliessend im Rotationstest gestresst und die Trübung nach verschiedenen Zeiträumen bestimmt. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben.

	Anzahl Prüfmuster mit Trübung > 18 FNU nach:					
Beschreibung	0 h	8 h	16 h	32 h	40 h	56 h
HMR1964 Ohne Zusatz	0	5	-	-	-	-
HMR1964 +15 µg/ml Zn	0	0	0	0	4	5

10

Der Zusatz von Zink kann die entstehende Trübung der Lösung zeitlich deutlich verzögern und stabilisiert dadurch die HMR1964 Formulierung. Ohne Zusatz von Zink weist die Zubereitung schon nach 8 Stunden im Rotationstest eine deutliche Trübung auf.

15

Beispiel 2: Stabilisierung von HMR1964 durch Zusatz von Polysorbat 20 (Tween® 20) im Rotationstest

- a) Zu einer wässrigen Lösung, die in der finalen Formulierung 3,15 mg/ml m-Kresol, 5 mg/ml NaCl und 6 mg/ml Trometamol enthält wird zinkfreies HMR1964 (so berechnet, dass in der fertigen Formulierung eine Konzentration 3,5 mg/ml entsteht) gelöst und der pH Wert mit 1 N Salzsäure/1 N NaOH auf 7,2 – 7,4 (gemessen bei Raumtemperatur) eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser zum Endvolumen aufgefüllt und über einen 0,2 µm Filter steril filtriert. Anschliessend wird sie in 5 ml Injektionsfläschchen gefüllt und mit Kappen verschlossen.

20

25

- b) Eine Vergleichslösung wird identisch hergestellt, jedoch wird vor dem Auffüllen mit Wasser eine entsprechende Menge einer 0,1 %igen Polysorbat 20 (Tween® 20)

Stammlösung hinzugefügt, sodass sich in der fertigen Formulierung eine Konzentration von 10 µg/ml ergibt.

- 5 Jeweils 5 Muster werden anschliessend im Rotationstest gestresst und die Trübung nach verschiedenen Zeiträumen bestimmt. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben.

	Anzahl Prüfmuster mit Trübung > 18 FNU nach:					
Beschreibung	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h
HMR1964 Ohne Zusatz	0	5	-	-	-	-
HMR1964 + 10 µg/ml Tween® 20	0	0	0	0	5	-

- 10 Der Zusatz von Polysorbat 20 verzögert das Auftreten von Trübungen sehr deutlich.

Beispiel 3: Stabilisierung von HMR1964 durch Zusatz von Poloxamer im Rotationstest

- 15 a) Zu einer wässrigen Lösung, die in der finalen Formulierung 4,5 mg/ml Phenol, 5 mg/ml NaCl und 6 mg/ml Trometamol enthält wird zinkfreies HMR1964 (so berechnet, dass in der fertigen Formulierung eine Konzentration 3,5 mg/ml entsteht) gelöst und der pH Wert mit 1 N Salzsäure/1 N NaOH auf 7,2 – 7,4 (gemessen bei Raumtemperatur) eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser zum Endvolumen
- 20 aufgefüllt und über einen 0,2 µm Filter steril filtriert. Anschliessend wird sie in 5 ml Injektionsfläschchen gefüllt und mit Kappen verschlossen.
- b) Eine Vergleichslösung wird identisch hergestellt, jedoch wird vor dem Auffüllen mit Wasser eine entsprechende Menge einer 0,1 %igen Poloxamer 171 (z.B. Genapol®)
- 25 Stammlösung hinzugefügt, sodass sich in der fertigen Formulierung eine Konzentration von 10 µg/ml ergibt.

Jeweils 5 Muster werden anschliessend im Rotationstest gestresst und die Trübung nach verschiedenen Zeiträumen bestimmt. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben.

	Anzahl Prüfmuster mit Trübung > 18 FNU nach:					
Beschreibung	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h
HMR1964 ohne Zusatz	0	5	-	-	-	-
HMR1964 + 0.01 mg/ml Poloxamer 171	0	0	0	2	5	-

5

Auch der Zusatz von Poloxamer 171 verzögert das Auftreten von Trübungen deutlich und stabilisiert die Zubereitung.

Beispiel 4: Stabilisierung von HMR1964 durch Zusatz von Polysorbat 20 bzw. Polysorbat 80 im Schütteltest

- 5 a) Zu einer wässrigen Lösung, die in der finalen Formulierung 3,15 mg/ml m-Kresol, 5 mg/ml NaCl und 6 mg/ml Trometamol enthält wird zinkfreies HMR1964 (so berechnet, dass in der fertigen Formulierung eine Konzentration von 3,5 mg/ml entsteht) gelöst und der pH Wert mit 1 N Salzsäure/1 N NaOH auf 7,2 – 7,4 (gemessen bei Raumtemperatur) eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser zum Endvolumen aufgefüllt und über einen 0,2 µm Filter steril filtriert. Anschliessend
10 wird sie in 5 ml Injektionsfläschchen gefüllt und mit Kappen verschlossen.
- b) Eine Vergleichslösung wird identisch hergestellt, jedoch wird vor dem Auffüllen mit Wasser eine entsprechende Menge einer 0,1 %igen Polysorbat 20 (Tween® 20) Stammlösung hinzugefügt, sodass sich in der fertigen Formulierung eine
15 Konzentration von 10 µg/ml ergibt.
- b) Eine weitere Vergleichslösung wird identisch wie unter b) hergestellt, diesmal wird jedoch anstelle von Polysorbat 20 Polysorbat 80 (Tween® 80) verwendet.
- 20 Die Proben werden bei 30°C auf einem Laborschüttler geschüttelt (60 U/min) und die Trübung der Proben nach bestimmten Zeiten gemessen. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben.

	Schütteltest, Trübung (FNU) nach				
Zusatz	Start	1 Woche	2 Woche	3 Woche	4 Woche
Ohne Zusatz	0,55	2,04	4,86	6,12	10,51
0,01 mg/ml Tween 20	1,75	2,60	2,44	2,44	3,80
0,01 mg/ml Tween 80	2,38	2,98	2,86	3,01	4,14

- 25 Sowohl der Zusatz von Polysorbat 20 als auch von Polysorbat 80 haben einen stabilisierenden Effekt auf HMR1964 im Schütteltest.

Beispiel 5: Stabilisierung von HMR1964 durch Zusatz von Zink oder Poloxamer (Genapol®) im Schütteltest

- 5 a) Zu einer wässrigen Lösung, die in der finalen Formulierung 3,3 mg/ml Phenol, 5 mg/ml NaCl und 6 mg/ml Trometamol enthält wird zinkfreies HMR1964 (so berechnet, dass in der fertigen Formulierung eine Konzentration von 3,5 mg/ml entsteht) gelöst und der pH Wert mit 1 N Salzsäure/1 N NaOH auf 7,2 – 7,4 (gemessen bei Raumtemperatur) eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser zum Endvolumen aufgefüllt und über einen 0,2 µm Filter steril filtriert. Anschliessend
10 wird sie in 5 ml Injektionsfläschchen gefüllt und mit Kappen verschlossen.
- b) Eine Vergleichslösung wird identisch hergestellt, jedoch wird vor dem Auffüllen mit Wasser eine entsprechende Menge einer 0,1 %igen Poloxamer 171 (Genapol®) Stammlösung hinzugefügt, sodass sich in der fertigen Formulierung ein Gehalt von
15 10 µg/ml ergibt.
- c) Eine weitere Vergleichslösung wird wie unter a) beschrieben hergestellt, jedoch wird anstelle von Poloxamer der Lösung vor dem Auffüllen mit Wasser eine entsprechende Menge einer 0,1%igen Zinkchlorid Stammlösung hinzugefügt,
20 sodass sich in der fertigen Formulierung eine Konzentration von 15 µg/ml Zink ergibt.

	Schütteltest, Trübung (FNU) nach				
Zusatz	Start	1 Woche	2 Woche	3 Woche	4 Woche
Keiner	0,39	0,70	4,46	8,74	14,11
0,01 mg/ml Poloxamer	0,36	0,57	0,52	1,59	0,89
0,015 mg/ml Zn	1,02	0,68	0,70	0,56	0,86

25 Sowohl ein Zusatz von Zink als auch der Zusatz von Poloxamer verhindern das Auftreten von Trübungen im Schütteltest.

Beispiel 6: Stabilisierung von HMR1964 durch Zusatz von Poloxamer im Rotationstest

a) Zu einer wässrigen Lösung, die in der finalen Formulierung 3,3 mg/ml Phenol, 5 mg/ml NaCl und 6 mg/ml Trometamol enthält wird zinkfreies HMR1964 (so berechnet, dass in der fertigen Formulierung eine Konzentration von 3,5 mg/ml entsteht) gelöst und der pH Wert mit 1 N Salzsäure/1 N NaOH auf 7,2 – 7,4 (gemessen bei Raumtemperatur) eingestellt. Die Lösung wird mit Wasser zum Endvolumen aufgefüllt und über einen 0,2 µm Filter steril filtriert. Anschliessend wird sie in 5 ml Injektionsfläschchen gefüllt und mit Kappen verschlossen.

b) Eine Vergleichslösung wird identisch hergestellt, jedoch wird vor dem Auffüllen mit Wasser eine entsprechende Menge einer 0,1 %igen Poloxamer 171 (Genapol®) Stammlösung hinzugefügt, sodass sich in der fertigen Formulierung eine Konzentration von 100 µg/ml ergibt.

Jeweils 5 Muster werden anschliessend im Rotationstest gestresst und die Trübung nach verschiedenen Zeiträumen bestimmt. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle wiedergegeben.

	Anzahl Prüfmuster mit Trübung > 18 FNU nach:					
Beschreibung	0 h	8 h	16 h	24 h	32 h	40 h
HMR1964 Ohne Zusatz	0	5	-	-	-	-
HMR1964 + 0,10 mg/ml Poloxamer 171	0	0	0	0	1	5

Der Zusatz von 100 µg/ml Poloxamer stabilisiert die HMR1964 Zubereitung ebenfalls sehr deutlich.

Patentansprüche:

1. Pharmazeutische Formulierung enthaltend ein Polypeptid ausgewählt aus einer Gruppe enthaltend Insulin, ein Insulinanalogon, ein Insulinderivat, einen aktiven
5 Insulinmetaboliten oder Kombinationen davon;
ein Tensid oder Kombinationen mehrerer Tenside;
optional ein Konservierungsmittel oder Kombinationen mehrerer
Konservierungsmittel; und optional ein Isotonisierungsmittel, Puffer oder weitere
Hilfsstoffe oder Kombinationen davon, wobei die pharmazeutische Formulierung
10 frei von oder arm an Zink ist.
2. Pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 1, wobei das Tensid
ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend Alkali-, Amin-, Erdalkaliseifen,
Alkylsulfate, Alkylsulfonate, natürliche Tenside, kationische Tenside,
15 Fettalkohole, Fettsäuren, Partial- und Fettsäureester und -ether mehrwertiger
Alkohole, des Glycerols, Sorbitols und der Saccharose, Polyole.
3. Pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 2, wobei die genannten Seifen
ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Stearate, Palmitate, Oleate,
20 Rizinolate.
4. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 2 und 3, wobei die
Sulfate ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Natriumlaurylsulfat,
Natriumcetylsulfat, Natriumstearylsulfat.
25
5. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4, wobei die
natürlichen Tenside ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend
Gallensäuresalze, Saponine, Arabisches Gummi, Lecithine.
- 30 6. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 5, wobei die
kationischen Tenside ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend
Alkoniumhalogenide, Cetylpyridiniumchlorid, Cetrimid®.

7. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 6, wobei die Fettalkohole ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Cetylalkohol, Stearylalkohol, Cholesterol.
- 5 8. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 7, wobei die Partial- und Fettsäureester und -ether der mehrwertigen Alkohole, des Glycerols und Sorbitols ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Span[®], Tween[®] (Polysorbat), Myrj[®], Brij[®], Triton[®], Cremophor[®].
- 10 9. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 2 bis 8 wobei die Polyole ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Polypropylenglycole, Polyethylenglycole, Poloxamere, Pluronic, Tetronics
- 15 10. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das Konservierungsmittel ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend Phenol, Kresol, Chlorkresol, Benzylalkohol, Parabene.
- 20 11. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei das Isotonisierungsmittel ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend Mannitol, Sorbitol, Lactose, Dextrose, Trehalose, Natriumchlorid, Glycerol.
- 25 12. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11, wobei die Hilfsstoffe ausgewählt werden aus einer Gruppe enthaltend Puffersubstanzen wie z.B. TRIS, Phosphat, Citrat, Acetat, Glycylglycin oder weiterer Stoffe wie Säuren, Laugen, Salze, Protamin, Arginin, Surfen[®].
- 30 13. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, wobei das Insulinanalogon ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend Gly(A21), Arg(B31), Arg(B32), Humaninsulin, Lys(B3), Glu(B29), Humaninsulin, Asp(B28) Humaninsulin, Lys(B28) Pro(B29) Humaninsulin, Des(B30) Humaninsulin

14. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, wobei das Insulinderivat ausgewählt wird aus einer Gruppe enthaltend B29-N-myristoyl-des(B30) Humaninsulin, B29-N-palmitoyl-des(B30) Humaninsulin, B29-N-myristoyl Humaninsulin, B29-N-palmitoyl Humaninsulin, B28-N-myristoyl Lys^{B28}Pro^{B29} Humaninsulin, B28-N-palmitoyl-Lys^{B28}Pro^{B29} Humaninsulin, B30-N-myristoyl-Thr^{B29}Lys^{B30} Humaninsulin, B30-N-palmitoyl-Thr^{B29}Lys^{B30} Humaninsulin, B29-N-(N-palmitoyl-γ-glutamyl)-des(B39) Humaninsulin, B29-N-(N-lithocholyl-γ-glutamyl)-des(B30) Humaninsulin, B29-N-(ω-carboxyheptadecanoyl)-des(B30) Humaninsulin and B29-N-(ω-carboxyheptadecanoyl) Humaninsulin.
15. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der vorigen Ansprüche, bei der das Insulin, das Insulinanalogon, das Insulinderivat und/oder der Insulinmetabolit in einer Konzentration von 60 – 6000 nmol/ml vorliegt.
16. Pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 15, wobei das Insulin, das Insulinanalogon, das Insulinderivat und/oder der Insulinmetabolit in einer Konzentration von 240 – 3000 nmol/ml vorliegt
17. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der vorigen Ansprüche, bei der das Tensid in einer Konzentration von 0,1 – 10000 µg/ml vorliegt.
18. Pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 17, bei der das Tensid in einer Konzentration von 1 – 1000 µg/ml vorliegt.
19. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 10 – 18, bei der Glycerol und/oder Mannitol in einer Konzentration von 100 – 250 mM vorliegt.
20. Pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 19, bei der Chlorid in einer Konzentration von bis zu 150 mM vorliegt

21. Pharmazeutische Formulierung gemäß einem der vorigen Ansprüche, bei der eine Puffersubstanz in einer Konzentration von 5 – 250 mM vorliegt.
- 5 22. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutische Formulierung gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 21, wobei die Komponenten in Form wäßriger Lösungen zusammengegeben werden, anschließend der gewünschte pH-Wert eingestellt und auf das Endvolumen mit Wasser aufgefüllt wird.
- 10 23. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutische Formulierung gemäß Anspruch 22, wobei die Endkonzentration von 3,15 mg/ml Kresol, 3,5 mg/ml HMR 1964, 6,0 mg/ml Trometamol, 5,0 mg/ml NaCl, und 0,1 mg/ml Tween® 20 erreicht werden.
- 15 24. Pharmazeutische Formulierung erhältlich nach einem der Ansprüche 22 oder 23.

International Application No
PCT/EP 02/02625

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 166 529 A (LILLY CO ELI) 2 January 1986 (1986-01-02)	1,2, 9-12,22, 24
Y	page 5, line 1 -page 8, line 6; claims 1-9; tables 1,2 ---	1-24
X	US 4 153 689 A (HIRAI SHIN-ICHIRO ET AL) 8 May 1979 (1979-05-08)	1,2,9, 22,24
Y	column 2, line 3 - line 32; example 4 ---	1-24
X	EP 0 200 383 A (LILLY CO ELI) 5 November 1986 (1986-11-05) column 5, line 20 - line 49; claims 1,2; tables 1-3 ---	1-3,8,9
	--- -/--	

☒ Patent family members are listed in annex.

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *G* document member of the same patent family

04/09/2002

Authorized officer
Winger, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 02/02625

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 42749 A (HAELUND SVEND ;NOVONORDISK AS (DK)) 1 October 1998 (1998-10-01) page 5, line 2 -page 6, line 6; claims 1,7,8,10,14-17; examples 2,3,8 ---	1,2,5, 10,11, 13,14
X	US 5 506 203 A (BAECKSTROEM KJELL G E ET AL) 9 April 1996 (1996-04-09) column 4, line 5 - line 20 column 5, line 7 - line 56; table III ---	1-3,5
X	WO 00 74736 A (DELRX PHARMACEUTICAL CORP ;LIBBEY MILES AUGUSTUS III (US); WILLIAM) 14 December 2000 (2000-12-14) examples 1-3 ---	1,2,4,8
Y	LOUGHEED W D ET AL: "Physical stability of insulin formulations." DIABETES. UNITED STATES MAY 1983, vol. 32, no. 5, May 1983 (1983-05), pages 424-432, XP001096187 ISSN: 0012-1797 abstract; tables ---	1-24
Y	THUROW H ET AL: "Stabilisation of dissolved proteins against denaturation at hydrophobic interfaces." DIABETOLOGIA. GERMANY, WEST AUG 1984, vol. 27, no. 2, August 1984 (1984-08), pages 212-218, XP001096189 ISSN: 0012-186X abstract; tables -----	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/02625

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0166529	A	02-01-1986	CA 1244347 A1	08-11-1988
			DE 3576458 D1	19-04-1990
			DK 236185 A	30-11-1985
			EP 0166529 A1	02-01-1986
			JP 61022026 A	30-01-1986
			US 4839341 A	13-06-1989
US 4153689	A	08-05-1979	GB 1554157 A	17-10-1979
			BE 841870 A1	16-11-1976
			DE 2620483 A1	23-12-1976
			FR 2313914 A1	07-01-1977
			JP 51148013 A	18-12-1976
EP 0200383	A	05-11-1986	AU 584184 B2	18-05-1989
			AU 5606386 A	23-10-1986
			CA 1274774 A1	02-10-1990
			DK 161386 A	16-10-1986
			EP 0200383 A2	05-11-1986
			IL 78425 A	12-05-1991
			JP 62207221 A	11-09-1987
			NZ 215737 A	26-04-1989
			ZA 8602628 A	25-11-1987
WO 9842749	A	01-10-1998	AU 742591 B2	10-01-2002
			AU 6612098 A	20-10-1998
			BR 9808285 A	16-05-2000
			CN 1259142 T	05-07-2000
			WO 9842749 A1	01-10-1998
			EP 1005490 A1	07-06-2000
			HU 0000547 A2	28-08-2000
			JP 2001506272 T	15-05-2001
			NO 994520 A	17-09-1999
			PL 335777 A1	22-05-2000
			US 6310038 B1	30-10-2001
			US 2001039260 A1	08-11-2001
US 5506203	A	09-04-1996	AT 183920 T	15-09-1999
			AT 206046 T	15-10-2001
			AU 692780 B2	18-06-1998
			AU 7090194 A	17-01-1995
			AU 692781 B2	18-06-1998
			AU 7090294 A	17-01-1995
			BR 9406907 A	02-04-1996
			BR 9406908 A	02-04-1996
			CN 1127471 A	24-07-1996
			CN 1129904 A	28-08-1996
			CZ 9503393 A3	15-05-1996
			CZ 9503428 A3	15-05-1996
			DE 69420412 D1	07-10-1999
			DE 69420412 T2	13-04-2000
			DE 69428442 D1	31-10-2001
			DE 69428442 T2	11-07-2002
			DK 706382 T3	13-03-2000
			DK 706383 T3	10-12-2001
			EE 3221 B1	15-10-1999
			EE 3222 B1	15-10-1999
			EG 20599 A	30-09-1999
			EG 21484 A	28-11-2001

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No
PCT/EP 02/02625

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5506203	A	EP 0706382 A1	17-04-1996
		EP 0706383 A1	17-04-1996
		ES 2138087 T3	01-01-2000
		ES 2162865 T3	16-01-2002
		FI 956227 A	22-12-1995
		FI 956228 A	22-12-1995
		GR 3031974 T3	31-03-2000
		HK 1009584 A1	14-04-2000
		HU 75065 A2	28-03-1997
		HU 75066 A2	28-03-1997
		IL 110084 A	14-07-1999
		IL 110085 A	14-06-2001
		JP 8512027 T	17-12-1996
		JP 9500621 T	21-01-1997
		LT 1976 A ,B	25-05-1995
		LT 1977 A ,B	31-01-1995
		MX 9404761 A1	31-01-1995
		MX 9404762 A1	31-01-1995
		NO 955226 A	15-02-1996
		NO 955227 A	20-02-1996
		NZ 268137 A	24-10-1997
		NZ 268138 A	24-10-1997
		NZ 328475 A	27-04-2001
		NZ 328476 A	28-05-1999
		PL 312205 A1	01-04-1996
		PL 312210 A1	01-04-1996
		PT 706383 T	28-03-2002
		RU 2159108 C2	20-11-2000
WO 0074736	A	14-12-2000	
		AU 5936400 A	28-12-2000
		EP 1187639 A1	20-03-2002
		WO 0074736 A1	14-12-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/02625

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 A61K38/28 A61K47/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, MEDLINE, WPI Data, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 166 529 A (LILLY CO ELI) 2. Januar 1986 (1986-01-02)	1,2, 9-12,22, 24
Y	Seite 5, Zeile 1 -Seite 8, Zeile 6; Ansprüche 1-9; Tabellen 1,2	1-24
X	US 4 153 689 A (HIRAI SHIN-ICHIRO ET AL) 8. Mai 1979 (1979-05-08)	1,2,9, 22,24
Y	Spalte 2, Zeile 3 - Zeile 32; Beispiel 4	1-24
X	EP 0 200 383 A (LILLY CO ELI) 5. November 1986 (1986-11-05) Spalte 5, Zeile 20 - Zeile 49; Ansprüche 1,2; Tabellen 1-3	1-3,8,9
	--- -/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung: die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. August 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/09/2002

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Winger, R

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/02625

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 98 42749 A (HAVELUND SVEND ;NOVONORDISK AS (DK)) 1. Oktober 1998 (1998-10-01) Seite 5, Zeile 2 -Seite 6, Zeile 6; Ansprüche 1,7,8,10,14-17; Beispiele 2,3,8 ---	1,2,5, 10,11, 13,14
X	US 5 506 203 A (BAECKSTROEM KJELL G E ET AL) 9. April 1996 (1996-04-09) Spalte 4, Zeile 5 - Zeile 20 Spalte 5, Zeile 7 - Zeile 56; Tabelle III ---	1-3,5
X	WO 00 74736 A (DELRX PHARMACEUTICAL CORP ;LIBBEY MILES AUGUSTUS III (US); WILLIAM) 14. Dezember 2000 (2000-12-14) Beispiele 1-3 ---	1,2,4,8
Y	LOUGHEED W D ET AL: "Physical stability of insulin formulations." DIABETES. UNITED STATES MAY 1983, Bd. 32, Nr. 5, Mai 1983 (1983-05), Seiten 424-432, XP001096187 ISSN: 0012-1797 Zusammenfassung; Tabellen ---	1-24
Y	THUROW H ET AL: "Stabilisation of dissolved proteins against denaturation at hydrophobic interfaces." DIABETOLOGIA. GERMANY, WEST AUG 1984, Bd. 27, Nr. 2, August 1984 (1984-08), Seiten 212-218, XP001096189 ISSN: 0012-186X Zusammenfassung; Tabellen -----	1-24

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT
Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/02625

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0166529 A	02-01-1986	CA 1244347 A1	08-11-1988
		DE 3576458 D1	19-04-1990
		DK 236185 A	30-11-1985
		EP 0166529 A1	02-01-1986
		JP 61022026 A	30-01-1986
		US 4839341 A	13-06-1989
US 4153689 A	08-05-1979	GB 1554157 A	17-10-1979
		BE 841870 A1	16-11-1976
		DE 2620483 A1	23-12-1976
		FR 2313914 A1	07-01-1977
		JP 51148013 A	18-12-1976
EP 0200383 A	05-11-1986	AU 584184 B2	18-05-1989
		AU 5606386 A	23-10-1986
		CA 1274774 A1	02-10-1990
		DK 161386 A	16-10-1986
		EP 0200383 A2	05-11-1986
		IL 78425 A	12-05-1991
		JP 62207221 A	11-09-1987
		NZ 215737 A	26-04-1989
		ZA 8602628 A	25-11-1987
WO 9842749 A	01-10-1998	AU 742591 B2	10-01-2002
		AU 6612098 A	20-10-1998
		BR 9808285 A	16-05-2000
		CN 1259142 T	05-07-2000
		WO 9842749 A1	01-10-1998
		EP 1005490 A1	07-06-2000
		HU 0000547 A2	28-08-2000
		JP 2001506272 T	15-05-2001
		NO 994520 A	17-09-1999
		PL 335777 A1	22-05-2000
		US 6310038 B1	30-10-2001
		US 2001039260 A1	08-11-2001
US 5506203 A	09-04-1996	AT 183920 T	15-09-1999
		AT 206046 T	15-10-2001
		AU 692780 B2	18-06-1998
		AU 7090194 A	17-01-1995
		AU 692781 B2	18-06-1998
		AU 7090294 A	17-01-1995
		BR 9406907 A	02-04-1996
		BR 9406908 A	02-04-1996
		CN 1127471 A	24-07-1996
		CN 1129904 A	28-08-1996
		CZ 9503393 A3	15-05-1996
		CZ 9503428 A3	15-05-1996
		DE 69420412 D1	07-10-1999
		DE 69420412 T2	13-04-2000
		DE 69428442 D1	31-10-2001
		DE 69428442 T2	11-07-2002
		DK 706382 T3	13-03-2000
		DK 706383 T3	10-12-2001
		EE 3221 B1	15-10-1999
		EE 3222 B1	15-10-1999
		EG 20599 A	30-09-1999
		EG 21484 A	28-11-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 02/02625

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5506203 A		EP 0706382 A1	17-04-1996
		EP 0706383 A1	17-04-1996
		ES 2138087 T3	01-01-2000
		ES 2162865 T3	16-01-2002
		FI 956227 A	22-12-1995
		FI 956228 A	22-12-1995
		GR 3031974 T3	31-03-2000
		HK 1009584 A1	14-04-2000
		HU 75065 A2	28-03-1997
		HU 75066 A2	28-03-1997
		IL 110084 A	14-07-1999
		IL 110085 A	14-06-2001
		JP 8512027 T	17-12-1996
		JP 9500621 T	21-01-1997
		LT 1976 A ,B	25-05-1995
		LT 1977 A ,B	31-01-1995
		MX 9404761 A1	31-01-1995
		MX 9404762 A1	31-01-1995
		NO 955226 A	15-02-1996
		NO 955227 A	20-02-1996
		NZ 268137 A	24-10-1997
		NZ 268138 A	24-10-1997
		NZ 328475 A	27-04-2001
		NZ 328476 A	28-05-1999
		PL 312205 A1	01-04-1996
		PL 312210 A1	01-04-1996
		PT 706383 T	28-03-2002
		RU 2159108 C2	20-11-2000
WO 0074736 A	14-12-2000	AU 5936400 A	28-12-2000
		EP 1187639 A1	20-03-2002
		WO 0074736 A1	14-12-2000